

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-116695

(43)Date of publication of application : 20.05.1988

(51)Int.Cl.

C12N 11/08
G01N 33/545

(21)Application number : 61-263194

(71)Applicant : NITTO ELECTRIC IND CO LTD

(22)Date of filing : 04.11.1986

(72)Inventor : TSUJI TAKASHI
MORI KENJIRO
KIHARA YASUO
WATANABE TETSUO

(54) CARRIER PARTICLE FOR IMMOBILIZING REDISPERSIBLE PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a carrier for immobilizing redispersible physiologically active substances, by activating a latex containing polymer particles having carboxyl groups with a water-soluble carbodiimide or N-hydroxysuccinimide and freeze-drying the activated polymer particles.

CONSTITUTION: Carbodiimide is added to a latex containing polymer particles with optionally linked spacer groups having 0.1W60 μ M/m², preferably 7W30 μ M/m² carboxyl groups, 0.03W3 μ m, preferably 0.05W1.5 μ m average particle diameter and a specific gravity within the range of 0.9W1.5 to give preferably 1W10mg/ml concentration thereof based on unit volume of the latex and reacted at pH 7W9 and 5W20° C temperature for several hr to activate the polymer particles. The resultant activated polymer particles are the freeze-dried to afford activated carrier particles. Alternatively, N-hydroxysuccinimide is reacted with the polymer particles with optionally linked spacer groups in the presence of a suitable water-soluble dehydration condensing agent to activate the polymer particles. The activated polymer particles are then freeze-dried to provide the aimed carrier particles.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁(JP)
⑪ 公開特許公報(A)

⑫ 特許出願公開
昭63-116695

⑬ Int.Cl.⁴
C 12 N 11/08
G 01 N 33/545

識別記号 庁内整理番号
7329-4B
B-7906-2G

⑭ 公開 昭和63年(1988)5月20日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全16頁)

⑮ 発明の名称 再分散性生理活性物質固定化用担体粒子

⑯ 特 願 昭61-263194

⑰ 出 願 昭61(1986)11月4日

⑱ 発 明 者 辻 幸 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東電気工業株式会社内
⑲ 発 明 者 森 健 二 郎 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東電気工業株式会社内
⑳ 発 明 者 木 原 康 夫 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東電気工業株式会社内
㉑ 発 明 者 渡 辺 哲 男 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東電気工業株式会社内
㉒ 出 願 人 日東電気工業株式会社 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号
㉓ 代 理 人 弁理士 牧野 逸 郎

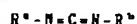
明 細 書

1. 発明の名称

再分散性生理活性物質固定化用担体粒子

2. 特許請求の範囲

(1) カルボキシル基を有する重合体粒子を含むラテックスを一般式



(式中、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立に炭素数5又は6のシクロアルキル基、炭素数2～12のアルキル基、モノアリアル基、モノアリアル置換低級アルキル基、モルホリノ基、ピペリジル基、低級アルキル置換モルホリニル基、低級アルキル置換ピペリジル基、ジ低級アルキルアミノ低級アルキル基又は低級アルキル置換ピリジル基を示す。)

で表わされる水溶性カルボジイミドで活性化した後、凍結乾燥してなることを特徴とする再分散性生理活性物質固定化用担体粒子。

(2) 重合体粒子が0.1～60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ のカルボキシル基を有することを特徴とする特許請求の

範囲第1項記載の再分散性生理活性物質固定化用担体粒子。

(3) 重合体粒子が平均粒子径0.03～3 μm を有することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の再分散性生理活性物質固定化用担体粒子。

(4) 重合体粒子が

(a)一般式



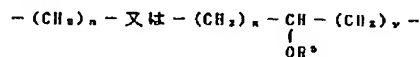
(但し、 R^1 は水素、低級アルキル基又はカルボキシル基を示し、 R^2 は水素又は低級アルキル基を示し、 R^1 が水素又は低級アルキル基のときは、 R^2 はカルボ低級アルコキシ基であってもよい。)

で表わされるアクリル酸誘導体0.1～20重量%、及び

(b)一般式



(但し、 R^1 は水素又は低級アルキル基を示し、 R^2 は



(但し、 m は0～12の整数を示し、 $x+y=m-1$ であり、 R^* は水素又はアセチル基を示す。)を示し、 A はそれぞれ独立に水素、フッ素又は CF_3 を示し、 n は0～12の整数を示す。)

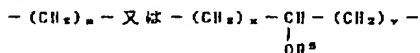
で表わされるアクリル酸フルオロアルキルエステル誘導体と、上記アクリル酸誘導体を除くラジカル共重合性ビニル単量体との混合物であつて、この混合物に基づいて上記アクリル酸フルオロアルキルエステル誘導体が1～100重量%である混合物99.9～80重量%

からなる単量体混合物を水性媒体中で乳化共重合させてなる水分散型高分子重合体粒子であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の再分散性生理活性物質固定化用担体粒子。

(6) カルボキシル基を有する重合体粒子を含むラテックスを N -ヒドロキシスクシンイミドで活性化した後、凍結乾燥してなることを特徴とする再分散性生理活性物質固定化用担体粒子。

3

R^* は



(但し、 m は0～12の整数を示し、 $x+y=m-1$ であり、 R^* は水素又はアセチル基を示す。)を示し、 A はそれぞれ独立に水素、フッ素又は CF_3 を示し、 n は0～12の整数を示す。)

で表わされるアクリル酸フルオロアルキルエステル誘導体と、上記アクリル酸誘導体を除くラジカル共重合性ビニル単量体との混合物であつて、この混合物に基づいて上記アクリル酸フルオロアルキルエステル誘導体が1～100重量%である混合物99.9～80重量%

からなる単量体混合物を水性媒体中で乳化共重合させてなる水分散型高分子重合体粒子であることを特徴とする特許請求の範囲第5項記載の再分散性生理活性物質固定化用担体粒子。

3. 発明の詳細な説明

5

(6) 重合体粒子が0.1～60 μ mol/mlのカルボキシル基を有することを特徴とする特許請求の範囲第5項記載の再分散性生理活性物質固定化用担体粒子。

(7) 重合体粒子が平均粒子径0.03～3 μ mを有することを特徴とする特許請求の範囲第5項記載の再分散性生理活性物質固定化用担体粒子。

(8) 重合体粒子が

(a)一般式



(但し、 R^1 は水素、低級アルキル基又はカルボキシル基を示し、 R^2 は水素又は低級アルキル基を示し、 R^1 が水素又は低級アルキル基のときは、 R^2 はカルボ低級アルコキシ基であつてもよい。)

で表わされるアクリル酸誘導体0.1～20重量%、及び

(b)一般式



(但し、 R^3 は水素又は低級アルキル基を示し、

4

産業上の利用分野

本発明は、再分散性生理活性物質固定化用担体粒子に関し、詳しくは、酵素、抗体等のような生理活性物質を共有結合にて固定化するための再分散性担体粒子に関する。

従来の技術

生理活性物質、例えば、酵素を水不溶性のラテックス粒子に固定化してなる固定化酵素は、その回収が容易であると共に、酵素の変性や失活が起こり難いために、近年、工業的な酵素反応に広く用いられている。また、生理活性物質としてレクチンをラテックス粒子に固定化したものは、レクチンの糖類との結合能力を利用して、糖類の分離や精製に用いられる。更に、生理活性物質として抗原若しくはハプテン、又は抗体をラテックス粒子に結合したものは、対応する抗体、又は抗原若しくはハプテンをラテックス凝集反応として検出するための免疫学的診断試薬として広く実用化されている。

このように、生理活性物質をラテックス粒子に

6

結合するための方法として、従来、代表的には、ポリスチレンラテックス粒子の表面に生理活性物質を物理吸着させる方法と、カルボキシル基を有する重合体粒子の水性分散液、即ち、カルボキシル化ラテックスを構成する粒子に生理活性物質を共有結合にて結合させる方法とが知られている。上記物理吸着法は、操作が簡単であり、特別な試薬を必要とせず、更に、固定化に際しても、生理活性物質の活性の低下が殆ど生じない利点を有するところから、従来、広く用いられている。

しかし、物理吸着法においては、生理活性物質は単にラテックス粒子の表面に吸着されているのみであるので、生理活性物質がラテックス粒子から容易に解離し、例えば、前記した免疫学的診断試薬として用いた場合に、ラテックス凝集反応を阻害し、或いは自然凝集を生じたりして、診断の精度を低下させる問題がある。また、生理活性物質によつては、ラテックス粒子に吸着せず、或いは吸着量が少なく、所要の活性を有するラテックス粒子を得ることができない場合もあり、更に、

pH等の環境条件に敏感である等の問題もある。

他方、共有結合法によれば、生理活性物質はラテックス粒子に強固に結合されているので、容易に解離することはないが、反面、固定化操作が煩瑣であり、且つ、高度の技術を必要とし、更に、生理活性物質が結合されたラテックス粒子は、一般には、分散性がよくない。特に、共有結合法にてカルボキシル化ラテックス粒子に生理活性物質を結合する際に、水溶性縮合脱水剤としてのカルボジイミドにて活性化したラテックス粒子は、水性媒体中での保存性に劣るために、生理活性物質の固定化操作の都度、ラテックス粒子の活性化を行なう必要があるもので、再現性よく生理活性物質を固定化することが困難である。

カルボキシル化ラテックス粒子をN-ヒドロキシスクシンイミドにて活性化する方法も知られている。この方法による活性化ラテックス粒子は、上記カルボジイミドによる活性化ラテックス粒子に比べて、その水性媒体中での分散性は幾分は改善されているものの、長期の保存に耐えるほどの

7

8

安定性をもつには至らない。

そこで、活性基が乾燥状態においては保存安定性が高いことを利用して、例えば、アガロースゲルを活性化し、乾燥し、粒子状とした活性化担体粒子、例えば、アガロースゲルの水酸基を臭化シアンにて活性化したCNBr-活性化セファロース4B、各種の官能基を付与した活性化CH-セファロース4Bやエポキシ活性化セファロース6B(いずれもファーマシア・フライン・ケミカルズ社製)等が既に知られている。

しかし、これら活性化担体粒子は、45~200 μ mの粒径を有し、主としてアフィニティ・クロマトグラフィー用の充填剤として用いられるものであつて、元来、分散性はもたないので、水性媒体中での分散安定性が要求される用途には用いることができない。かかる分散安定性が要求される用途として、例えば、前記したような免疫学的診断試薬や、或いは担体粒子に酵素を固定化し、水性媒体中に分散させて、基質と反応させる酵素反応等を挙げることができる。

このような分散安定性が要求される用途には、従来、一般に粒径0.03~3 μ mの微細なラテックス粒子が用いられている。しかし、これらラテックス粒子は、乾燥すれば、相互に融着凝集するので、水性媒体中に再分散させても、当初の微細な粒子として分散しない。

発明が解決しようとする問題点

そこで、生理活性物質を結合したラテックスに乳糖のような分散剤を加え、これを凍結乾燥して、再分散性を有する粉末物質を得る方法が特開昭52-117420号公報に記載されている。また、特開昭58-123459号公報には、生理活性物質を固定化したラテックスを保護剤としてのグリセリンの水溶液で処理した後に、自然乾燥又は通気乾燥して、保存性にすぐれる乾燥粒子を製造する方法が記載されている。

しかし、従来、生理活性物質を固定化すべき担体粒子自体を水性媒体中で再分散性を有する乾燥担体粒子とする方法は知られておらず、他方、乾燥担体粒子と共に分散剤や保護剤が存在するとき

9

10

は、乾燥担体粒子を水性媒体中に再分散させ、生理活性物質を固定化する際にその固定化を妨げ、或いは固定化された生理活性物質の活性を低下させることがあるので、分散剤や保護剤を用いる前記方法は、再分散性を有する乾燥担体粒子を得る場合には適用し得ない。

本発明は、生理活性物質を固定化すべきラテックス担体粒子を乾燥するに際して、上記のような分散剤や保護剤のような薬剤を用いることなくして、保存性、水性媒体中での再分散性及び生理活性物質の固定化時の再現性にすぐれる生理活性物質固定化用担体粒子を提供することを目的とする。
問題点を解決するための手段

本発明による再分散性生理活性物質固定化用担体粒子の第1は、カルボキシル基を有する重合体粒子を含むラテックスを一般式



(式中、 R^a 及び R^b はそれぞれ独立に炭素数5又は6のシクロアルキル基、炭素数1~12のアルキル基、モノアリール基、モノアリール置換低級ア

ルキル基、モルホリノ基、ピペリジル基、低級アルキル置換モルホリニル基、低級アルキル置換ピペリジル基、ジ低級アルキルアミノ低級アルキル基又は低級アルキル置換ピリジル基を示す。)で表わされる水溶性カルボジイミドで活性化した後、凍結乾燥してなることを特徴とする。

また、本発明による再分散性生理活性物質固定化用粒子担体の第2は、カルボキシル基を有する重合体粒子を含むラテックスをN-ヒドロキシスクシンイミドで活性化した後、凍結乾燥してなることを特徴とする。

本発明において、生理活性物質とは、前述した酵素、補酵素や、抗体若しくはバプテン、抗原、ホルモン等のように、生物学的又は生化学的な反応活性を有する有機物質、通常、高分子量タンパク質を意味する。

本発明において活性化剤として用いる水溶性カルボジイミドは前記一般式で表わされ、また、これらの酸付加塩や第4級アミンも用いることができる。前記一般式において、シクロアルキル基と

1 1

しては例えばシクロヘキシル基を、アルキル基としては例えばエチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、sec-ブチル、イソブチル、tert-ブチル、アミル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル等を、モノアリール基として例えばフェニル基を、モノアリール置換低級アルキル基として例えばベンジル基を、低級アルキル置換モルホリニル基として例えばエチルモルホリニル基を、低級アルキル置換ピペリジル基として例えばエチルピペリジル基を、低級アルキル置換ピリジル基として例えば α 、 β 又は γ -メチル又はエチルピリジル基をそれぞれ挙げるができる。尚、上記において、低級アルキル基とは、炭素数1~4のアルキル基を意味するものとする。

本発明による担体粒子を製造するための重合体粒子は、水分散型高分子重合体粒子であつて、カルボキシル基を有することが必要であり、特に、水溶性カルボジイミド又はN-ヒドロキシスクシンイミドで活性化し、凍結乾燥してなる粉末を水

1 2

性媒体中に再分散させたときにすぐれた分散性を有するように、重合体粒子は、当初、即ち、活性化前は、その表面に0.1~60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ のカルボキシル基数を有することが好ましい。特に好ましくは0.7~30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ の範囲である。重合体粒子の有するカルボキシル基数が余りに少ないときは、凍結乾燥した粉末が水性媒体中での再分散性に劣り、水性媒体中に再分散させてときに凝集を起こすと共に、十分な量のカルボジイミドやN-ヒドロキシスクシンイミドを結合させることができず、延いては、得られる活性化担体粒子に十分な量の生理活性物質を固定化することができない。他方、重合体粒子の有するカルボキシル基数が余りに多いときも、再分散させたときに水性媒体中にて凝集することがあり、或いは生理活性物質を固定化したときに、その生化学的反應を阻害するおそれがある。

尚、後述するように、重合体粒子は好ましくは遊離カルボキシル基を有する所謂スペース基が結合されるが、重合体粒子表面のカルボキシル基と

1 3

1 4

は、重合体粒子がこのようにスぺーサ基が結合されているときは、重合体粒子が本来有するカルボキシル基とスぺーサ基の有するカルボキシル基との合計量を意味するものとする。

重合体粒子上のカルボキシル基量は、後述するように、乳化共重合における所定の単量体組成のうち、アクリル酸誘導体の使用量によつて任意に調整することができる。

本発明において、重合体粒子は、その平均粒径が $0.03 \sim 3 \mu\text{m}$ 、好ましくは $0.05 \sim 1.5 \mu\text{m}$ である。粒径が小さすぎると、例えば、これを担体とする固定化酵素を水中に分散させて酵素反応を行なせた後の回収が困難となり、一方、粒径が大きすぎると、単位体積当りの粒子表面積が小さくなり、例えば、酵素の固定化量が少なくなると共に、水中に分散させるのが困難となるので好ましくない。

また、重合体粒子の比重は $0.9 \sim 1.5$ の範囲にあることが好ましい。比重が 0.9 よりも小さいときは、例えば、酵素反応において、粒子が水性媒

体の表面に浮遊し、分散安定性に劣るようになり、また、酵素活性も低下し、一方、 1.5 よりも大きいときは、粒子が水性媒体中に沈降、凝集し、粒子の自由度が失われて、例えば、酵素活性が低下するからである。

生理活性物質は、本発明による再分散性活性化担体粒子に共有結合にて結合されるが、特に、生理活性物質は、担体粒子に共有結合にてスぺーサ基を介して固定化されることが好ましい。このように、担体粒子に共有結合によつてスぺーサ基が結合され、このスぺーサ基に共有結合によつて生理活性物質が固定化されることにより、固定化された生理活性物質の担体粒子上での自由度が高められるからである。換言すれば、本発明による再分散性生理活性物質固定化用担体粒子は、重合体粒子に遊離カルボキシル基を有するスぺーサ基が共有結合にて結合され、このスぺーサ基の有する上記カルボキシル基がカルボジイミド又はN-ヒドロキシスクシンイミドにて活性化されていることが好ましい。

15

上記スぺーサ基として用い得る化合物は、アミノ基とカルボキシル基とを有する少なくとも二官能性の有機化合物であり、多官能性の重合体を排除するものではないが、特に、炭素数 $1 \sim 12$ の炭素鎖基を有し、アミノ基とカルボキシル基とを有する二官能性の有機化合物が好ましい。このようなスぺーサ基として機能する化合物の具体例として、例えば、グリシン、 β -アミノプロピオン酸、 γ -アミノ酪酸、 ϵ -アミノカプロン酸、 ϵ -アミノカプリル酸等のアミノアルキルカルボン酸、リジン、グルタミン酸、 β -アラニン、アルギニン、グリシルグリシルグリシン等のアミノ酸類等が好ましく用いられるが、これらに限定されるものではない。

カルボキシル基を有する重合体粒子に前記したスぺーサ基を結合させるには、水溶性カルボジイミドの存在下に重合体粒子にスぺーサ基のための化合物を反応させ、重合体粒子の有するカルボキシル基とスぺーサの有するアミノ基との間にアミド結合を形成させればよい。このように、カルボ

キシル基にアミノ基を反応させて、スぺーサ基を結合させる方法は、既によく知られている。

カルボキシル基を有する重合体粒子又は前述したようなスぺーサ基が結合された重合体粒子（遊離カルボキシル基を有する。）を水溶性カルボジイミドにて活性化するには、例えば、千畑一郎ほか著「実験と応用アフィニティ・クロマトグラフィー」（1976年講談社発行）に記載されているように、一般に、カルボキシル基をカルボジイミドにて活性化する通常の方法及び条件によればよい。例えば、カルボキシル基を有する重合体粒子又はスぺーサ基が結合された重合体粒子を含むラテックスに適宜量、例えば、ラテックスの単位容量当りに $0.01 \sim 10 \text{ mg/ml}$ となるように水溶性カルボジイミドを添加し、通常の条件、例えば pH を $4 \sim 9$ に保持して、 $5 \sim 60^\circ\text{C}$ 程度の温度で数分乃至数十時間、通常、 $1 \sim 5$ 時間程度反応させればよい。特に、得られる活性化担体粒子が凍結乾燥後にすぐれた再分散を有するためには、用いるカルボジイミドの量をラテックスの単位容量当り

16

17

18

に1~10mg/mlとし、pH7~9、温度5~20℃で数時間反応させるのが好適である。

また、カルボキシル基を有する重合体粒子又は遊離カルボキシル基を有するスベータ基が結合された重合体粒子をN-ヒドロキシスクシンイミドで活性化するには、適宜の水溶性脱水縮合剤の存在下にN-ヒドロキシスクシンイミドを反応させ、上記カルボキシル基との間にエステル結合を形成させればよい。上記水溶性脱水縮合剤としては、通常、水溶性カルボジイミドが好適であり、例えば、1-エチル-3-((3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)塩酸塩、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド-メト- ρ -トルエンスルホネート等が用いられる。

このように、カルボキシル基を有する重合体粒子又はスベータ基を結合された重合体粒子にN-ヒドロキシスクシンイミドを結合させる場合にも、前記文献に記載されているように、通常の方法及び条件によることができ、通常は、カルボキシル

基を有する重合体粒子又はスベータ基が結合された重合体粒子をカルボジイミドで活性化する場合と同じ条件によればよい。

このようにして重合体粒子又はスベータ基を結合された重合体粒子をカルボジイミド又はN-ヒドロキシスクシンイミドにて活性化した後、遠心分離、透析又は濾過等の適宜の方法によつて、活性化重合体粒子から未反応の活性化剤や縮合剤、副生物等を除去することが好ましい。これらが残存するときは、活性化ラテックス粒子の凍結乾燥品が水性媒体中での再分散性に劣ることとなるからである。

本発明において、ラテックスの凍結乾燥方法は、特に、限定されるものではないが、通常は、ラテックスを-70℃から-80℃の温度で凍結乾燥させる。この後、減圧下に水分を除去することによつて、本発明による再分散性にすぐれる活性化担体粒子を得ることができる。かかる本発明による活性化担体粒子は、これを水性媒体中に再分散させ、生理活性物質を反応させることによつて、

19

直ちに且つ容易にこれを固定化することができる。

本発明においては、重合体粒子は、前述した条件を満たすものであれば、特に限定されるものではないが、しかし、以下に述べるように、特に、アクリル酸誘導体とアクリル酸フルオロアルキルエステル誘導体とを含む単量体混合物を乳化共重合して得られる重合体粒子が好ましく用いられる。

かかる重合体粒子は、

(a)一般式



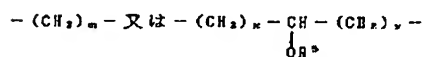
(但し、 R^1 は水素、低級アルキル基又はカルボキシル基を示し、 R^2 は水素又は低級アルキル基を示し、 R^1 が水素又は低級アルキル基のときは、 R^2 はカルボキシル基又は低級アルキル基であつてもよい。)で表わされるアクリル酸誘導体0.1~20重量%及び

(b)一般式



(但し、 R^1 は水素又は低級アルキル基を示し、 R^2 は

21



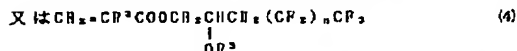
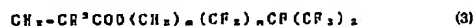
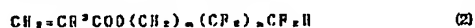
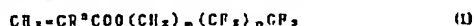
(但し、 m は0~12の整数を示し、 $x+y=m-1$ であり、 R^2 は水素又はアセチル基を示す。)を示し、 A はそれぞれ独立に水素、フッ素又は CF_3 を示し、 n は0~12の整数を示す。)で表わされるアクリル酸フルオロアルキルエステル誘導体と、上記アクリル酸誘導体を除くラジカル共重合性ビニル単量体との混合物であつて、この混合物に基づいて上記アクリル酸フルオロアルキルエステル誘導体が1~100重量%である混合物99.9~80重量%からなる単量体混合物を水性媒体中で乳化共重合させて得ることができる。

上記アクリル酸誘導体としては、例えば、アクリル酸、メタクリル酸、イタコン酸、クロトン酸、マレイン酸、フマル酸、モノアルキルマレイン酸、モノアルキルフマル酸、モノアルキルイタコン酸等を好ましい例として挙げることができるが、特に、アクリル酸、メタクリル酸及びイタコン酸の

22

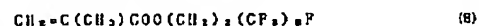
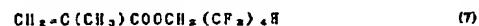
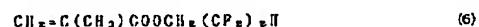
1 種又は 2 種以上の混合物が好ましく用いられる。

また、上記アクリル酸フルオロアルキルエステル誘導体は、好ましくは、一般式



(但し、 R^1 、 R^2 、 m 及び n は前記と同じである。)

で表わされ、従つて、特に、好ましく用いることができるアクリル酸フルオロアルキルエステル誘導体の具体例として、例えば、



等を例示することができる。

前記アクリル酸誘導体は、乳化共重合時の重合安定性にすぐれ、また、水性媒体中での分散安定性にすぐれる水分散型高分子重合体粒子を得るた

めのみならず、得られる重合体粒子を前記したようにカルボジイミドやN-ヒドロキシスクシンイミドにて活性化し、或いはスベリ性を付与するためのカルボキシル基を重合体粒子に付与するために必要な単量体であり、単量体組成において、少なくとも 0.1 重量%を必要とする。しかし、過多に共重合単量体成分として用いるときは、却つて重合安定性と、得られる重合体粒子の分散安定性を損なうので、20 重量%以下の範囲で用いられる。特に好ましい範囲は、0.5 ~ 10 重量%である。

また、前記アクリル酸フルオロアルキルエステル誘導体は、得られる重合体粒子の活性化時や、或いは活性化担体粒子への生理活性物質の固定化時の水性分散系において、粒子に水性媒体中で安定な分散性を保たしめる効果を有する。特に、重合体粒子において、アクリル酸フルオロアルキルエステル誘導体単量体成分は、塩や有機質物質を含む水溶液中において、例えば、重合体粒子への有害物質の吸着や被覆を防止する効果を有する。

2 3

このような効果を有効に得るためには、アクリル酸フルオロアルキルエステル誘導体は、単量体組成において 99.9 ~ 80 重量%、好ましくは 99.5 ~ 90 重量%の範囲で用いられる。

しかも、かかる単量体成分の所定の割合の混合物を用いることにより、特に乳化剤を用いることなく、凝集物の発生なしに安定に乳化共重合させ得て、粒径が均一であり、且つ、水性媒体中で分散状態が安定に保持される水分散型高分子重合体粒子を得ることができる。

前記アクリル酸フルオロアルキルエステル誘導体の一部は、前記アクリル酸誘導体を除くラジカル共重合性ビニル単量体に置換されてもよい。

かかるラジカル共重合性ビニル単量体としては、例えば、それ自体の単独重合体が水不溶性である疎水性単量体を挙げることができる。具体例として、エチレン、プロピレン、塩化ビニル等の α -オレフィン又はそのハロゲン置換体、スチレン、メチルスチレン、エチルスチレン、ビニルトルエン、クロロスチレン等のアルケニルベンゼン、ブ

2 5

タジエン、イソブレン等の共役ジオレフィン、(メタ)アクリロニトリル、(メタ)アクリル酸メチル、(メタ)アクリル酸エチル、(メタ)アクリル酸プロピル、(メタ)アクリル酸ブチル、(メタ)アクリル酸ヘキシル、(メタ)アクリル酸オクチル等の(メタ)アクリル酸エステル、酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル等を挙げることができる。上記したラジカル共重合性ビニル単量体のうちでは、特に、メタクリル酸メチルやメタクリル酸イソブチル等の(メタ)アクリル酸エステルが好ましく用いられる。このような単量体は、得られる重合体粒子の比重を調整し、又は前記したアクリル酸誘導体とアクリル酸フルオロアルキルエステル誘導体との共重合反応性を調整するために好適に用いられる。

また、必要に応じて、それ自体の単独重合体が水溶性又は水膨潤性である親水性単量体も用いることができる。かかる単量体の具体例として、例えば、ヒドロキシメチル(メタ)アクリレート、ヒドロキシエチル(メタ)アクリレート、ヒドロ

2 6

キシプロビル(メタ)アクリレート等のヒドロキシアルキル(メタ)アクリレート、(メタ)アクリルアミド、グリシジル(メタ)アクリレート等を挙げることができる。

しかし、上記したラジカル共重合性ビニル単量体は、余りに多量に使用すると、重合安定性を損じるのみならず、得られる重合体粒子が水分散安定性に劣るようになるので、本発明においては、アクリル酸フルオロアルキルエステル誘導体と上記ラジカル共重合性ビニル単量体との混合物において、アクリル酸フルオロアルキルエステル誘導体を少なくとも1重量%用いることが必要である。

即ち、本発明においては、上記ラジカル共重合性ビニル単量体は、このラジカル共重合性ビニル単量体とアクリル酸フルオロアルキルエステル誘導体との混合物の重量に基づいて、99重量%以下、好ましくは97重量%以下の範囲で用いられる。有効量の下限は特に制限されず、目的に応じて適宜に選ばれるが、通常、アクリル酸フルオロアルキルエステル誘導体とこのアクリル酸アルキ

ルエステル誘導体の混合物の重量に基づいて1重量%以上である。

更に、重合体粒子の製造において、単量体成分として、内部架橋用官能性単量体を用いることができる。この内部架橋用多官能性単量体は、重合体に架橋構造を導入するので、存在する場合には好ましくない水溶性重合体の生成を抑制すると共に、得られる重合体粒子のガラス転移温度を高めることができる。更に、内部架橋剤は、重合体粒子を非膨潤化して、重合体粒子の水性媒体中での分散安定性を高めるのに効果がある。

かかる多官能性内部架橋用単量体としては、例えば、脂肪族多価アルコールのポリ(メタ)アクリレートが好ましく用いられる。具体例として、例えば、エチレングリコールジメタクリレート、ジエチレングリコールジメタクリレート、トリエチレングリコールジメタクリレート、ジプロピレングリコールジメタクリレート、トリエチレングリコールジアクリレート、トリメチロールプロパント

27

リメタクリレート、トリメチロールプロパントリアクリレート、テトラメチロールメタンテトラアクリレート等が好ましく用いられる。また、ジビニルベンゼンや H_2N -メチレンビスアクリルアミド等も多官能性内部架橋用単量体として用いることができる。

内部架橋用多官能性単量体は、必要な場合は、通常、単量体組成において、0.1重量%以上が用いられるが、しかし、過多に使用するときは、却つて重合安定性と得られる重合体粒子の水性媒体中での分散安定性を損なうので好ましくなく、通常、20重量%以下の範囲で用いられる。好ましくは0.2~10重量%の範囲である。

また、個々の単量体の具体的な種類は、得られる共重合体のガラス転移点が0℃以上、好ましくは室温以上となるように選ばれる。重合体粒子のガラス転移点が0℃よりも低いときは、重合体粒子の相互の融着や凝集が生じやすく、分散液の分散安定性が低下する傾向があるからである。

以上のような各単量体を水性媒体中に、水溶

28

性のラジカル重合開始剤を用いて、通常の方法にて乳化共重合させることにより、水不溶性共重合体からなる水性分散液、即ち、ラテックスを得ることができるが、得られるラテックス中に乳化剤が遊離の状態で、或いは重合体粒子に吸着された状態にて存在するとき、前述したように、特に、その使用に際して種々の有害な影響が現れることがあるので、乳化共重合に際しては乳化剤を用いないのが好ましい。前記単量体組成によれば、乳化剤を要せずして安定に共重合させることができると共に、得られるラテックス粒子の分散状態が安定に保持される。しかし、前述したように、重合体粒子を緩衝液や生理食塩水に分散させた場合にも、重合体粒子の凝集や沈降が起こらず、更には、固定化された生理活性物質の生化学的反応が妨害されない範囲において、乳化剤を用いることは何ら妨げられず、また、乳化剤が有害な影響を与えない場合には、必要に応じて、乳化剤を用いてもよい。

上記のような乳化共重合において、単量体成分

29

30

混合物の水性媒体中での濃度は、得られるラテックスにおける重合体粒子の平均粒径とも関連するが、通常、1～40重量%の範囲である。

重合開始剤としては、水溶性ラジカル重合開始剤が用いられる。通常、過硫酸カリウム、過硫酸ナトリウム、過硫酸アンモニウム等の過硫酸塩や、これら過硫酸塩とチオ硫酸ナトリウム、チオ硫酸カリウム、チオ硫酸水素ナトリウム等のようなチオ硫酸塩、又は亜硫酸ナトリウム、亜硫酸カリウム、亜硫酸水素ナトリウム等のような亜硫酸塩とのレドックス系重合開始剤が好ましく用いられるが、これらに限定されるものではない。これら重合開始剤の使用量は、単量体混合物に対して0.01～1重量%の範囲が好適である。重合の雰囲気も、特に制限されないが、好ましくは酸素を除いた不活性ガス雰囲気が用いられる。また、重合温度は、特に制限されないが、通常、20～100℃、好ましくは40～90℃の範囲である。

発明の効果

以上のように、本発明によれば、何ら特別な薬

剤を用いることなくして、活性化された担体粒子を含むラテックスを凍結乾燥して、保存性、分散性、再現性にすぐれる再分散性生理活性物質固定化用担体粒子を得ることができ、しかも、かかる担体粒子は、それ自体既に活性化されているので、水性媒体に再分散させて、直ちに生理活性物質を固定化することができると共に、活性化担体粒子は、単位重量当たり非常に大きい表面積を有するので、高活性の固定化生理活性物質を得ることができる。

また、粒子担体を構成するための重合体粒子として、前述したようなアクリル酸誘導体とアクリル酸フルオロアルキルエステル誘導体とからなる共重合体を用いるとき、得られる担体粒子がその粒径分布において狭く、均一であり、且つ、水性媒体中での分散性に著しくすぐれるので、生理活性物質を固定化するに際して、高い活性収率を得ることができる。

実施例

以下に実施例を挙げて本発明を説明するが、本

3 1

3 2

発明はこれら実施例によつて何ら制限されるものではない。

活性化剤としてカルボジイミドを用いる実施例

実施例1～8及び比較例1～4

第1表に示す組成の単量体混合物90gを蒸留水350gに加え、次いで、これに過硫酸アンモニウム0.36gを蒸留水10gに溶解させた水溶液を70℃の温度で窒素気流下に加えた後、250rpmにて攪拌しつつ、7時間重合させて、カルボキシル化ラテックスを得た。重合状態、重合率、得られたラテックス粒子の平均粒径及び粒子表面のカルボキシル基量を第1表に示す。

次に、上記実施例1及び2において得たラテックス(固形分5重量%)50mlに1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド200mgを蒸留水10mlに溶解させた水溶液を加え、室温にて1時間反応させた後、スベータ基としての α -アミノカプロン酸の水溶液(0.03mol/l)50mlを加え、更に、室温にて5時間反応させた。この後、反応混合物を遠心分離洗浄して、

3 3

第 1 表

	単 量 体 組 成 (重量%) ¹⁾				重合状態	重合率 (%)	平均粒径 (μm)	粒子のカルボキシル基 ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)
	MMA	BFM	AA	TGD				
実施例 1	79	17	3	1	安定	99	0.25	7.3
実施例 2	72	17	10	1	安定	99	0.23	26.4
比較例 1	82	17	0	1	安定	99	0.29	0
比較例 2	56	17	25	2	凝集	—	0.22 ²⁾	69.5 ²⁾

(注) 1) MMA = メチルメタクリレート、BFM = 1H, 1H, 5H-オクタフルオロベンチルメタクリレート、AA = アクリル酸、TGD = トリエチレングリコールジメタクリレート。

2) 凝集物を蒸留水中に再分散させ、超音波分散させた後、濾紙 (No. 1) で濾過したものについての値である。

34

未反応の ϵ -アミノカブロン酸を除去し、スペーサ化ラテックス粒子を得た。

上記スペーサ化反応によつて得られたスペーサ化ラテックス粒子は、いずれも分散状態が安定であつた。また、実施例 1 のラテックス粒子からのスペーサ化ラテックス粒子 (これを実施例 3 とする。) の表面のカルボキシル基量は $1.9 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ であり、実施例 2 のラテックス粒子からのスペーサ化ラテックス粒子 (これを実施例 4 とする。) の表面のカルボキシル基量は $6.8 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ であつた。

次に、以上のようにして得た実施例 1 ~ 4 及び比較例 1 及び 2 のラテックス (固形分 5 重量%) 10 ml に 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド 10 mg をホウ酸緩衝液 (0.1 mol/l 、 $\text{pH} 8.0$) 1 ml に溶解させた水溶液を加え、10℃にて 1 時間攪拌して反応させた。この後、得られた活性化ラテックスを遠心分離し、上記と同じホウ酸緩衝液にて 2 回洗浄し、上記と同じホウ酸緩衝液に固形分 2.5 重量%となるよう

に再分散させた。また、このようにして得たそれぞれのラテックスを -70℃ に凍結し、減圧下に乾燥した。

これらラテックスの凍結乾燥品と当初のままのラテックスについて、所定期間保存した後、その保存安定性を以下のようにして評価した。即ち、ウシ血清アルブミン (アーマー社製) 40 mg をホウ酸緩衝液 (0.1 mol/l 、 $\text{pH} 8.0$) 10 ml に溶解した水溶液を当初のままのラテックス又は凍結乾燥品に蒸留水を加えて当初の固形分濃度に戻したラテックスに加え、4℃にて一晩放置した後、遠心分離にて未反応ウシ血清アルブミンを除去し、ラテックス粒子へのウシ血清アルブミンの固定化量にて、それぞれの保存安定性を評価した。結果を第 2 表及び第 1 図から第 5 図に示す。尚、第 2 表は、活性化ラテックスの調製直後の分散状態及びウシ血清アルブミンの固定化量と共に、これら活性化ラテックスの調製直後にその凍結乾燥品を調製し、これを水性媒体中に再分散させたときの分散状態及びウシ血清アルブミンの固定化量を示

35

36

第 2 表

	用いたラ テックス	粒子のカルボキシル基 ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	ラテックスのまま		凍 結 乾 燥 品	
			分散状態	結合量 (mg)	再分散状態	結合量 (mg)
実施例 5	実施例 1	7.3	A	16	A	13
実施例 6	実施例 2	26.4	A	20	A	18
実施例 7	実施例 3	1.9	A	9	A ~ B	7
実施例 8	実施例 4	6.8	A	15	A	12
比較例 3	比較例 1	0	B	—	D	—
比較例 4	比較例 2	69.5	B	22	C	18

(注) 分散状態の判定は次による。

条件：0.01 mol/l ホウ酸緩衝液 (pH 8.0)、粒子濃度 0.1 重量%。

判定基準：光学顕微鏡 (200 倍) にて観察し、下記による。

- A：均一であつて、凝集は認められない。
 B：肉眼では凝集は認められないが、顕微鏡では凝集の存在が認められる。
 C：肉眼でもよく見ると凝集が認められる。
 D：肉眼で明瞭な凝集が認められる。

37

し、他方、第1図から第5図は、活性化ラテックス及びその凍結乾燥品について、所定期間保存後に上記と同様にして調べた分散状態及びウシ血清アルブミンの固定化量を示す。

これらの結果から、本発明による活性化ラテックス粒子の凍結乾燥品は、3か月後も、これを水性媒体中に再分散させたとき、当初とほぼ同じ固定化量を示し、保存安定性にすぐれることが示される。

実施例 9

実施例 4 として得たラテックス (固形分 5 重量%) 10 ml に 1-シクロヘキシル-3-(2-メルホリノエチル) カルボジイミド-メト-ポートルエンシルホネート 10 mg をホウ酸緩衝液 (0.1 mol/l、pH 8.0) 1 ml に溶解した溶液を加え、10℃にて1時間、攪拌下に反応させた。この後、得られた活性化ラテックスを遠心分離し、上記と同じ緩衝液にて2回洗浄し、上記と同じ緩衝液に固形分 2.5 重量%となるように再分散させた。これを-70℃に凍結し、減圧下に乾燥した。

38

この凍結乾燥品を蒸留水にて当初の固形分濃度に戻し、これにペルオキシダーゼ (シグマ社製 Type IV) 40 mg をホウ酸緩衝液 (0.1 mol/l、pH 8.0) 10 ml に溶解させた溶液を加え、4℃にて一晚放置した後、遠心分離にて未反応のペルオキシダーゼを除去した。

このようにして得たラテックス粒子にはペルオキシダーゼ 7 mg が固定化されていた。このラテックスを光学顕微鏡 (200 倍) にて観察したところ、均一であつて、凝集は全く認められなかつた。また、このラテックスは、フエニレンジアミン (5 mmol/l) と過酸化水素 (1.5 mmol/l) の混合水溶液にて発色し、酵素活性が保持されていることが確認された。

実施例 10

実施例 7 として得たラテックス凍結乾燥品に蒸留水を加えて当初の固形分濃度とし、これに抗ヒト IgG (Dako 社製、4 mg/ml) 10 ml を加え、4℃にて一晚放置した。遠心分離によつて未反応抗ヒト IgG を除去し、洗浄した後、0.01 mol/l ホウ

39

酸緩衝液 (pH 8.0) にて固形分 1 重量% になるように希釈した。このラテックスには抗ヒト IgG 8 μ g が結合されており、これを光学顕微鏡にて観察したが、完全に均一であつて、凝集は全く認められなかった。

上記ラテックスとヒト IgG 溶液 (シグマ社製の凍結乾燥品を 0.01 mol/l ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) で希釈したもの) を等量混合したところ、ヒト IgG 0.1 μ g/ml まで、ラテックスの凝集が認められた。

活性化剤として N-ヒドロキシスクシンイミドを用いる実施例

実施例 11 ~ 14 及び比較例 5 ~ 6

1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド 10 μ g 及び N-ヒドロキシスクシンイミド 10 μ g をホウ酸緩衝液 (0.1 mol/l、pH 8.0) 1 ml に溶解させた水溶液を前記した実施例 1 ~ 4 及び比較例 1 及び 2 のそれぞれのラテックス (固形分 5 重量%) 1.0 ml に加え、10℃にて 1 時間攪拌して反応させた。この後、得られた

活性化ラテックスを遠心分離し、上記と同じホウ酸緩衝液にて 2 回洗浄し、上記と同じホウ酸緩衝液に固形分 2.5 重量% となるように再分散させた。また、このようにして得たそれぞれのラテックスを -70℃ に凍結し、減圧下に乾燥した。

これらラテックスの凍結乾燥品と当初のままのラテックスについて、その保存安定性を分散状態とウシ血清アルブミンの固定化量にて評価する前記した方法によつて調べた。結果を第 3 表及び第 6 図から第 10 図に示す。尚、第 3 表は、活性化ラテックスの調製直後の分散状態及びウシ血清アルブミンの固定化量と共に、これら活性化ラテックスの調製直後にその凍結乾燥品を調製し、これを水性媒体中に再分散させたときの分散状態及びウシ血清アルブミンの固定化量を示し、他方、第 6 図から第 10 図は、活性化ラテックス及びその凍結乾燥品について、所定期間保存後に上記と同様にして調べた分散状態及びウシ血清アルブミンの固定化量を示す。

本発明による活性化ラテックスの凍結乾燥品は、

40

41

第 3 表

	用いたラテックス	粒子のカルボキシル基 (μ mol/m ²)	ラテックスのまま		凍 結 乾 燥 品	
			分散状態	結合量 (ng)	再分散状態	結合量 (ng)
実施例 11	実施例 1	7.3	A	16	A	15
実施例 12	実施例 2	26.4	A	20	A	18
実施例 13	実施例 3	1.9	A	12	A	11
実施例 14	実施例 4	6.8	A	17	A	17
比較例 5	比較例 1	0	B	—	D	—
比較例 6	比較例 2	69.5	B	20	B	17

(注) 分散状態の判定は次による。

条件: 0.01 mol/l ホウ酸緩衝液 (pH 8.0)、粒子濃度 0.1 重量%。

判定基準: 光学顕微鏡 (200 倍) にて観察し、下記による。

- A: 均一であつて、凝集は認められない。
- B: 肉眼では凝集は認められないが、顕微鏡では凝集の存在が認められる。
- C: 肉眼でもよく見ると凝集が認められる。
- D: 肉眼で明瞭な凝集が認められる。

3か月後に水性媒体中に再分散させたときも、当初とほぼ同じ分散状態及び固定化量を示し、保存安定性にすぐれることが示される。

実施例 15

実施例 4 として得たラテックス（固形分 5 重量 %）10 ml に 1-シクロヘキシル-3-（モルホリノエチル）カルボジイミド-メト-ｐ-トルエンスルホネート 10 mg 及び N-ヒドロキシスクシンイミド 10 mg をホウ酸緩衝液（0.1 mol/l、pH 8.0）1 ml に溶解した溶液を加え、10℃にて1時間、攪拌下に反応させた。この後、得られた活性化ラテックスを遠心分離し、上記と同じ緩衝液にて2回洗浄し、上記と同じ緩衝液に固形分 2.5 重量 % となるように再分散させた。これを-70℃にて凍結し、減圧下に乾燥した。

このラテックスの凍結乾燥品を蒸留水にて当初の固形分濃度に戻し、これにペルオキシダーゼ（シグマ社製 Type IV）40 mg をホウ酸緩衝液（0.1 mol/l、pH 8.0）10 ml に溶解させた溶液を加え、4℃にて一晚放置した後、遠心分離にて

未反応のペルオキシダーゼを除去した。

このようにして得たラテックス粒子にはペルオキシダーゼ 9 mg が固定化されていた。このラテックスを光学顕微鏡（200倍）にて観察したところ、均一であつて、凝集は全く認められなかつた。また、このラテックスは、フェニレンジアミン（5 mmol/l）と過酸化水素（1.5 mmol/l）の混合水溶液にて発色し、酵素活性が保持されていることが確認された。

実施例 16

実施例 13 として得たラテックス凍結乾燥品に蒸留水を加えて当初の固形分濃度とし、これに抗ヒト IgG（Dako 社製、4 mg/ml）10 ml を加え、4℃で一晩放置した。遠心分離によつて未反応抗ヒト IgG を除去し、洗浄した後、ホウ酸緩衝液（0.01 mol/l、pH 8.0）にて固形分 1 重量 % になるように希釈した。このラテックスには抗ヒト IgG 11 mg が結合されており、これを光学顕微鏡にて観察したが、完全に均一であつて、凝集は全く認められなかつた。

43

44

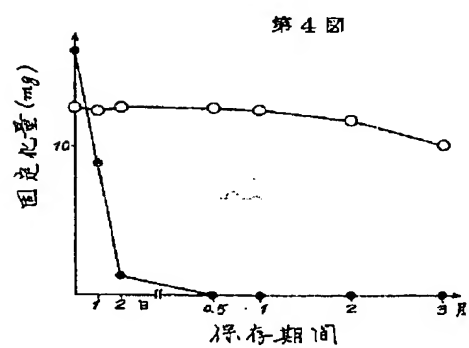
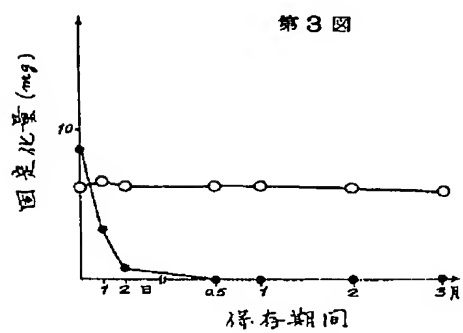
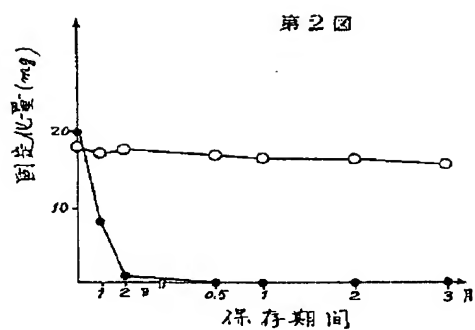
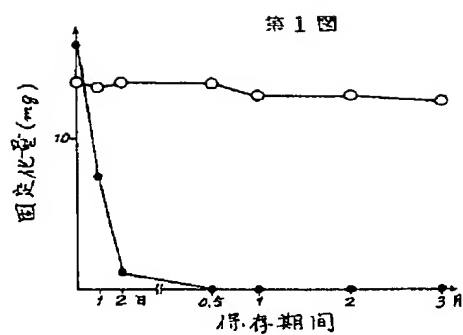
上記ラテックスとヒト IgG 溶液（シグマ社製の凍結乾燥品をホウ酸緩衝液（0.01 mol/l、pH 7.0）で希釈したもの）を等量混合したところ、ヒト IgG 0.1 μg/ml まで、ラテックスの凝集が認められた。

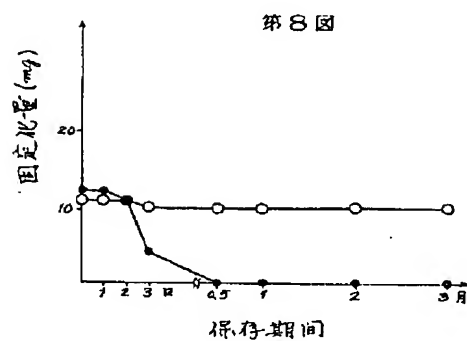
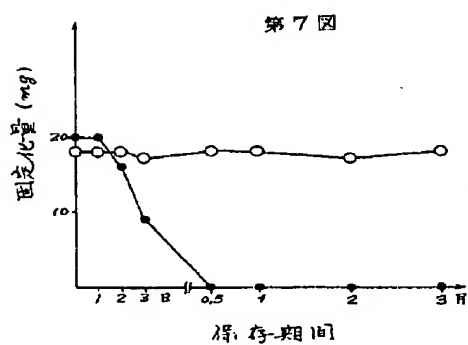
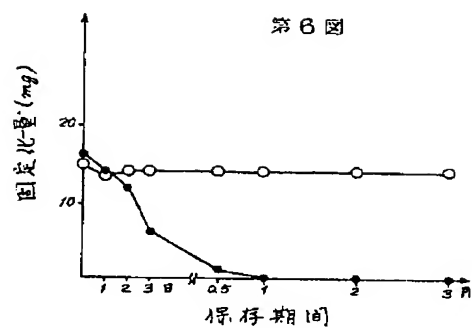
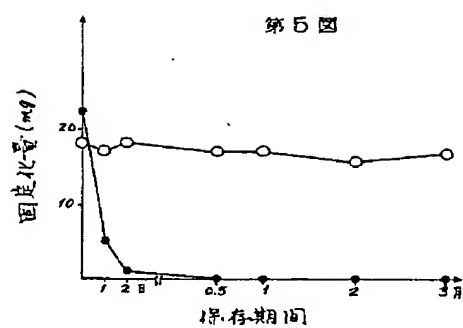
4. 図面の簡単な説明

第1図から第5図は、活性化剤としてカルボジイミドを用いて得た本発明による担体粒子と比較例としての担体粒子の保存期間とウシ血清アルブミンの固定化量との関係を示すグラフ、第6図から第10図は、活性化剤としてN-ヒドロキシスクシンイミドを用いて得た本発明による担体粒子と比較例としての担体粒子の保存期間とウシ血清アルブミンの固定化量との関係を示すグラフである。

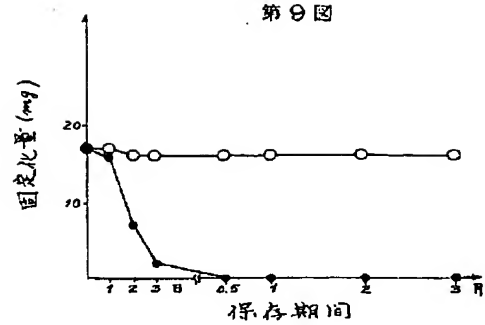
特許出願人 日東電気工業株式会社
代理人 弁理士 牧 野 逸 郎

45





第9図



第10図

